UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1951 N° 99

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MILIEUX DE CULTURE DESTINÉS A L'ISOLEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1951

par

GEORGES FONTÉS
EXTERNE DES HOPITAUX

MEMBRES DU JURY :

MM.	ANDRIEU	Président
	GADRAT	Assesseurs
	BAUDOT	
M^me^	ENJALBERT	
M.	BAZEX	Suppléant

IMPRIMERIE REISE - 2 RUE DE LA JEUNESSE - TOULOUSE

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES
MILIEUX DE CULTURE
DESTINÉS A L'ISOLEMENT
DES BACILLES TUBERCULEUX

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1951 N° 99

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES

MILIEUX DE CULTURE DESTINÉS A L'ISOLEMENT DES BACILLES TUBERCULEUX

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
Présentée et soutenue publiquement en Octobre 1951

par

GEORGES FONTÉS
EXTERNE DES HOPITAUX

MEMBRES DU JURY :

MM. ANDRIEU — Président
GADRAT, BAUDOT, Mme ENJALBERT — Assesseurs
M. BAZEX — Suppléant

IMPRIMERIE REISE - 2 RUE DE LA JEUNESSE - TOULOUSE

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

	MM.
Doyen	LEFEBVRE.
Assesseur	BRUSTIER.
Doyens honoraires	GORSE, CALVET.

Professeurs honoraires :
MM. RISPAL, MÉRIEL, RIBAUT
LAFFORGUE, SERR, GARIPUY, VALL

PROFESSEURS

	MM.		MM.
Clinique de neurologie et psychiatrie	RISER.	Pathologie int. et clin. des maladies de la tuberculose	MOREL.
Clinique médicale	TAPIE, (N).	Bactériologie - Hygiène - Médecine sociale	ANDRIEU.
Clinique obstétricale	GUILHEM.		
Physiologie	SOULA.	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE.
Clinique chirurgicale et du cancer	DUCUING.	Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.).
Physique biologique et médicale	BUGNARD	Matière médicale	VINCENT.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	MÉRIEL (P.).
Chimie et toxicologie	BRUSTIER.	Anatomie pathologique	FABRE (J.).
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL.	Clin. oto-rhino-laryngologique et chir. maxillo-faciale	CALVET.
Clinique chirurgicale et gynécologie	LEFEBVRE.	Clinique ophtalmologique	CALMETTES.
Anatomie	LAZORTHES.	Chimie biologique	VALDIGUIÉ.
Histoire naturelle	DELAS.	Médecine lég. et du travail	PLANQUES.
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL (R.).	Histologie et embryologie	BROUSSY.
Pharmacie	CAUJOLLE.	Médecine sociale	BOUNHOURE.
Chimie gén. pharm.	BLANC. (Ch. de F.)	Thérapeutique	GADRAT.
Professeur à titre personnel	BAISSET.	Pathologie chirurgicale	CRIMOUD.
		Stomatologie	CADENAT.

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Anatomie	M. COULOUMA.

MAITRES DE CONFÉRENCES — AGRÉGÉS

	MM.		MM.
Anatomie	POULHÈS.	Bactériologie	Mme ENJALBER
Histologie	BIMES.	Chimie biologique	POLONOVSKI.
Sciences naturelles	BOUISSET.	Physique médicale	AUVERGNAT.
Pharmacie	COUTURIER.	Botanique	Mme D.-MATHO

AGRÉGÉS

	MM.		MM.
Médecine	DARNAUD.	Obstétrique	PONTONNIER.
	GÉRAUD.	Chirurgie	RIEUNAU.
	DARDENNE.		DIEULAFÉ.
	LAPORTE (J.).		DAMBRIN (P.).
	BAUDOT.	Oto-rhino-laryngologie	CLAUX.
Ophtalmologie	DEODATI.	Urologie	LHEZ.
Physique médicale	MARQUÈS.		

COURS COMPLÉMENTAIRES

	MM.		MM.
Législation pharmaceutique	BOUISSET.	Psychiatrie	GAYRAL.
Tuberculose	MOREL.	Chimie analytique	BLANC.
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT.	Hydrologie et géologie	ASTRE.
Dermatol. et syphiligraphie	BAZEX.	Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS.
Chimie minérale	BLANC.	Pharmacodynamie Méd.)	BAISSET.
Chimie pathologique	VALDIGUIÉ (P.).	Pharmacodynamie (Pharm.)	CAUJOLLE.
Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	GUILHEM.	Bactériologie et hygiène	LAPORTE.
Cryptogamie	Mme D.-MATHOU.	Urologie	LHEZ.
Parasitologie	BAUDOT.	Ophtalmologie	DEODATTI.
Histologie	PLANEL.	Neuro-chirurgie	LAZORTHES.
Chimie biologique	DOUSTE-BLAYZ.	Mycologie	MORQUER.
		Physiologie	LAPORTE (Y)

Secrétaire de la Faculté..... ARGILAS.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération du 12 mai 1891).

R.UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA GRAND-MÈRE

A MES PARENTS

En gage de notre profonde affection.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES ANDRIEU

Professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine Sociale,
Chevalier de la Légion d'honneur.

Il nous a fait l'honneur de bien vouloir présider à la soutenance de cette thèse inaugurale.

Le Diplôme d'Hygiène nous avait déjà fait bénéficier de son précieux enseignement.

Qu'il veuille trouver, dans ce modeste travail, l'hommage de notre respectueuse gratitude.

A NOTRE MAÎTRE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JEAN BAUDOT

Médecin Phtisiologue en Chef des Hôpitaux.

Nous n'oublierons jamais l'accueil qu'il nous a réservé dans son service où il nous a fait l'honneur de nous accepter parmi ses élèves. Qu'il trouve ici l'hommage de notre respectueux et sincère attachement.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MADAME LE PROFESSEUR ENJALBERT

Professeur Agrégé de Bactériologie.

Qui, au cours d'un voyage d'étude aux Etats-Unis, a pu se familiariser avec les différentes techniques de M. le Docteur DUBOS, et qui a accepté avec gentillesse de faire partie de notre jury de thèse, ce dont nous la remercions vivement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES GADRAT

Professeur de Thérapeutique,
Médecins des Hôpitaux.

Nous lui sommes profondément reconnaissant d'avoir bien voulu siéger à notre jury de thèse, et le prions de croire à notre vive gratitude.

MONSIEUR LE DOCTEUR BAZEX

Chargé de cours à la Faculté de Médecine.
Vénérologiste des Hôpitaux.

En très fidèle hommage.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ANDRÉ DELAUDE

Médecin Phtisiologue, Assistant des Hôpitaux,
chargé du Laboratoire de Recherches Phtisiologiques.

Il nous a apporté, dans l'accomplissement de ce travail, une aide précieuse et jamais démentie, pleine de sollicitude et rehaussée de l'amitié qu'elle a fait naître entre nous.

INTRODUCTION

« Il n'y a pas à espérer que la culture du bacille de Koch joue un grand rôle dans l'étude de la maladie. »

Ainsi s'exprimait R. KOCH [1], découragé par les échecs successifs qu'il avait éprouvés en recherchant un milieu susceptible de cultiver le bacille qu'il avait décrit.

Aujourd'hui, l'isolement du bacille tuberculeux par des milieux de culture électifs est devenu un des procédés usuels du diagnostic de la lésion tuberculeuse. C'est dire l'importance des progrès réalisés dans le domaine de la bactériologie de la tuberculose, depuis la découverte du bacille.

L'examen radio-clinique ne constitue, en effet, qu'une étape d'orientation du diagnostic. L'examen direct des produits pathologiques est souvent en défaut. Même après homogénéisation, un résultat négatif ne peut permettre d'éliminer à coup sûr la nature tuberculeuse du produit examiné.

A l'époque où les progrès de la radiologie, où la pratique du dépistage systématique permettent de saisir la lésion tuberculeuse à son extrême début, il est nécessaire de recourir à des méthodes d'isolement sensibles, capables de détecter les bacilles tuberculeux dans les produits pathologiques où ils se trouvent en tout petit nombre.

Les milieux de culture actuels le permettent. Mais, s'ils donnent satisfaction, ils sont loin de réunir l'ensemble des qualités que l'on pourrait demander à un milieu idéal.

Aussi, chaque fois qu'un milieu, récemment mis au point est soumis à l'appréciation des bactériologistes et des cliniciens, est-il intéressant d'en pratiquer une étude objective, pour en déceler qualités et défauts, à la recherche des éléments nouveaux qu'il nous apporte.

Le milieu solide de Dubos, à l'acide oléique, nous a paru présenter un intérêt certain.

Sous les conseils éclairés de M. le Professeur Jean BAUDOT, et sous les directives techniques du Dr DELAUDE, chef du Laboratoire de Recherches Phtisiologiques, nous nous sommes proposés de pratiquer des essais de culture sur ce milieu, et de comparer les résultats avec ceux obtenus sur les milieux de LŒWENSTEIN-JENSEN et de HERROLD.

Nous tenons à exprimer notre gratitude au personnel du Laboratoire des Recherches Phtisiologiques dont la subsistance matérielle est sous la dépendance de la Caisse Nationale de la Sécurité Sociale.

LA NAISSANCE ET L'ÉVOLUTION DES MILIEUX DE DUBOS

C'est en étudiant les divers facteurs de croissance du bacille tuberculeux que R. DUBOS et ses associés ont mis au point divers milieux de culture donnant une pousse rapide de colonies typiques.

Les premiers milieux étaient liquides. Ce n'est que plus tard qu'apparut le milieu solide, but de notre étude.

A. *Les milieux liquides.*

En 1945, DUBOS notait l'apparition rapide de pousses « submergées », à l'intérieur même du liquide constituant le milieu étudié [2].

Depuis cette époque, l'addition de nouveaux produits a permis une multiplication encore plus rapide de faibles inoculats [3]. C'est ainsi que l'Albumine du sérum purifiée, certains acides gras à longue chaîne [4], et en particulier l'acide oléique, furent introduits dans le milieu, pour de meilleurs résultats [5], [6].

Grâce à l'adjonction de Tween 80, cette série d'études permettait la mise au point, en 1946, d'un milieu liquide rendant possible la production homogène de jeunes cultures.

De nombreuses variations du milieu de DUBOS ainsi proposé, ont été expérimentées par FOLEY [7].

En France, GERNEZ-RIEUX a pratiqué une étude approfondie du milieu [8].

Ces auteurs, et tous ceux qui ont expérimenté le milieu de Dubos, concluent à ses nombreux avantages, surtout en ce qui concerne la rapidité de l'identification du bacille de Koch.

Mais chacun formule des réserves quant à son emploi systématique :

« Ces milieux ne peuvent être employés seuls pour l'identification du bacille de Koch » [7].

« Les résultats sont sujets à de grandes modifications suivant la quantité ensemencée » [9].

« L'impossibilité d'étudier les caractères culturaux macroscopiques est l'une des infériorités du milieu de DUBOS qui ne doit pas se substituer au milieu à l'œuf » [10].

CORPER-COHN et FREY [11] préfèrent, en définitive, le milieu solide à l'œuf qui donne des résultats plus sûrs pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose.

Ce qui nous ramène aux

B. *Milieux solides.*

Depuis l'apparition du dosage de la résistance aux antibiotiques, beaucoup de bactériologistes préfèrent les milieux solides, qui permettent une appréciation plus sensible de l'importance de la croissance dans les différents tubes [9].

C'est pourquoi, par l'adjonction de Gelose, et sans modifier sensiblement les différents constituants, R. DUBOS a mis au point le milieu solide que nous nous proposons d'étudier [12].

LE MILIEU SOLIDE DE DUBOS A L'ACIDE OLÉIQUE

I. Sa composition.

Il s'agit d'un milieu solide, de couleur blanchâtre, transparent, dont la préparation ne présente aucune difficulté, grâce à l'emploi du milieu de base et du complexe Albumine-Acide Oléique, spécialement préparés par les Laboratoires DIFCO, de Détroit (Michigan).

1° Le milieu de base (Oleic Agar Base) se présente sous forme d'une poudre blanche, très fine.

Il a la composition suivante :

	GRAMMES
Caséine	0,5
Asparagine	1
$PO^4 K H^2$	1
$PO^4 H Na^2$	2,5
Citrate de Fer Ammoniacal	0,050
$SO^4 Mg^7 H^2O$	0,010
$Ca Cl^2$	0,0005
$SO^4 Zn$	0,0001
$SO^4 Cu$	0,0001
Gélose	15

4 g. 20 de cette poudre sont mis dans 180 cc. d'eau distillée froide, et dissouts en portant à l'ébullition, sous agitation intermittente permettant l'homogénéisation du milieu.

On stérilise ensuite à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes.

2° Lorsque le liquide est revenu à une température d'environ 50°, ou ajoute 20 cc. du complexe Albumine-Acide Oléique, contenus dans les tubes stériles préparés par DIFCO.

3° On ajoute également 5 à 10.000 unités de Pénicilline et l'on répartit en tubes stériles qui seront conservés à la glacière, une fois le milieu solidifié.

Le pH final est de 6,6.

Le Tween 80, substance mouillante procurant l'homogénéité de la culture dans les milieux liquides, a été remplacé ici par l'Acide Oléique. Celui-ci permet d'éviter, en partie, la pousse des germes d'association. Il augmente, en outre, la consommation d'O^2 et permet d'accélérer la vitesse de multiplication.

L'action toxique de l'Acide Oléique est neutralisée par l'Albumine du Sérum [13] qui a aussi une valeur comme aliment azoté [14].

L'emploi de la Pénicilline [15] évite la croissance de la plupart des germes associés, sans gêner la pousse du bacille de Koch [16].

Aussi R. Dubos et H. Noufflard concluent : « Il y a intérêt à utiliser, pour l'examen bactériologique des produits souillés, un milieu sans Tween et additionné de Pénicilline [17].

La plupart des auteurs pratiquent leurs ensemencements dans des boîtes de Pétri.

Pour des raisons d'ordre technique, il nous a été plus facile d'utiliser les tubes ordinairement employés au Laboratoire de Phtisiologie.

Nous avons cependant eu la curiosité de pratiquer quelques ensemencements sur boîtes de Pétri. Reconnaissons qu'elles donnent entière satisfaction pour la lecture et l'isolement des pousses.

II. Son utilisation.

A. *L'ensemencement.*

Les produits pathologiques ensemencés comprennent :

a) Des produits souillés : crachats, liquides de tubage gastrique, urines. Ces échantillons proviennent, pour la plupart, du Bloc de Phtisiologie de Purpan ;

b) Des liquides Céphalo-Rachidiens : envoyés, en grande partie, par les Services de M. le Professeur RISER et de M. le Professeur Jean TAPIE.

Les produits souillés sont traités préalablement par 1/10e de leur volume de soude normale, et sous agitation de 30 minutes. La centrifugation à 2.500 tours pendant 5 minutes permet d'obtenir un culot qui est, par la suite, suspendu dans 2 cc. de sérum physiologique. Chaque tube de culture est ensemencé avec 1/10e de cc. de la suspension.

Les liquides Céphalo-Rachidiens sont ensemencés directement, sans préparation.

Il y a intérêt à ensemencer plusieurs tubes à la fois, pour augmenter les chances de développement. Comme l'ont signalé BEZANÇON, BRAUN et MEYER [18], un seul tube peut donner des colonies, les autres restant stériles.

Pour notre compte, nous avons employé 4 tubes pour chaque culture sur le milieu de DUBOS, ce qui est un chiffre minimum.

Les tubes ainsi ensemencés sont placés dans une étuve à 37°, inclinés légèrement. Ils recevront notre visite quotidienne et seront soumis à un examen cherchant à déceler la moindre velléité de croissance.

On a intérêt à boucher soigneusement les tubes par des capuchons de caoutchouc, pour éviter la déshydratation du milieu. Cet assèchement survient, en général, rapidement, et nous a parfois empêché de lire les résultats. Lorsque la déshydratation n'est que partielle, la partie du milieu restée fraîche et humide permet, encore que difficilement, la lecture d'une pousse.

B. *Les prélèvements précoces.*

Nos ensemencements sont à l'étude. Quelle va être notre conduite ?

Suivons les conseils de DUBOS et de Mlle NOUFFLARD [17] :

« Il y a intérêt à ne pas attendre une croissance appréciable à l'œil nu, mais à prélever aseptiquement, tous les quelques jours, un échantillon de la culture, et à l'examiner sur lame. »

C'est ce que nous avons fait, à partir du quatrième jour; plus tôt, bien entendu, si notre attention était attirée par une pousse

quelconque (en général, d'ailleurs, ce n'étaient, à cette date, que des germes associés mal tués).

Au début, nous avions l'impression de promener notre anse de platine sur des milieux absolument stériles. Mais nous avons été obligé de constater que la méthode avait vraiment de l'intérêt lorsque la lame fourmillait de bacilles jeunes, en voie de multiplication.

Cette étude systématique des prélèvements précoces nous a permis de retrouver l'aspect typique décrit par DUBOS et MIDDLEBROOK [12] : « les Cordons ».

Il s'agit de bacilles, probablement en voie de multiplication, groupés régulièrement pour former des rangées compactes, plus ou moins longues, d'épaisseur variable, colorées en rouge par le Ziehl, et ressemblant à des cordons, isolés ou s'entrecoupant, rigides ou dessinant des boucles plus ou moins régulières.

Décrites sous le nom évocateur de «cordes serpentines» [18], ces formations sont composées de bacilles de Koch jeunes, disposés parallèlement à l'axe des cordons.

Cet aspect avait déjà été décrit sur les milieux liquides de DUBOS. Il semble, cependant, ne pas être l'apanage de ce milieu puisque l'on a découvert des « cordons entortillés » sur le milieu de BUC [20].

Il n'en reste pas moins que de telles figures ne peuvent pas tromper un observateur, même non averti, et permettent de reconnaître le bacille de Koch dès le premier coup d'œil.

Certains auteurs [21] ont pu mettre en évidence à un stade plus précoce, un aspect « en mailles de filet », qui serait constitué par des cordons à l'extrême début de leur développement.

Nous avons pu apercevoir, à plusieurs reprises, sur des lames très précocement étalées, des images semblables, sans que nous ayions pû déterminer exactement à quoi correspondaient de telles formations. Il est probable qu'avec des moyens techniques perfectionnés, on puisse arriver à découvrir et affirmer l'existence du bacille par la seule présence de ces images.

C'est ainsi que DUBOS et H. NOUFFLARD peuvent, dès le troisième jour, apercevoir au microscope, à travers la boîte de

PÉTRI, les colonies et déceler en elles une forme finement serpentine, organisation qui peut être considérée comme typique [17].

Il ne nous a pas été possible de pratiquer de tels examens. Il se peut, cependant, que la conformation serpentine de la colonie explique l'effilochement que nous avons constaté parfois, lorsque l'anse de platine râcle certaines de ces colonies.

Cet aspect de « cordons » est non seulement typique, mais permet d'établir un parallèle entre l'aspect des colonies et la virulence du bacille [22]. Il serait l'apanage des bacilles virulents, constatation confirmée par l'inoculation à la souris [23].

Après les premières constatations que nous venons de rapporter, et qui confirment pleinement des faits déjà observés, il nous a paru intéressant d'effectuer un travail personnel, destiné à comparer l'efficacité du milieu de DUBOS avec celle des milieux classiques, utilisés comme milieux de diagnostic au Laboratoire des Recherches Phtisiologiques :

Le milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN.
Le milieu de HERROLD.

A. Le milieu de LŒWENSTEIN modifié par JENSEN et HOLM.

Il s'agit d'une variation du classique milieu à l'œuf de LŒWENSTEIN, contenant glycérine, asparagine, fécule de pomme de terre et vert malachite.

Sans rentrer dans les détails de la préparation du milieu [24], disons seulement que les proportions d'ingrédients employés ont subi quelques légères modifications par rapport au milieu de LŒWENSTEIN. Surtout, la cuisson est conduite d'une façon différente.

B. La Gélose au jaune d'œuf ou milieu de HERROLD a été récemment introduite au Laboratoire par le Dr DELAUDE qui l'a mis au point avec KARLSON et NEEDHAM [25].

La technique de préparation et d'ensemencement ainsi que les avantages du milieu sont largement exposés dans sa thèse inaugurale [9].

FIGURE N° 1.

Microphotographie d'une coloration de Ziehl-Neelsen obtenue sur une lame précocement étalée. Elle montre le groupement typique des bacilles tuberculeux en « cordons ». — Noter la présence de quelques coccis qui ne gênent pas la pousse des bacilles (R. DUBOS-MIDDLEBROOK.

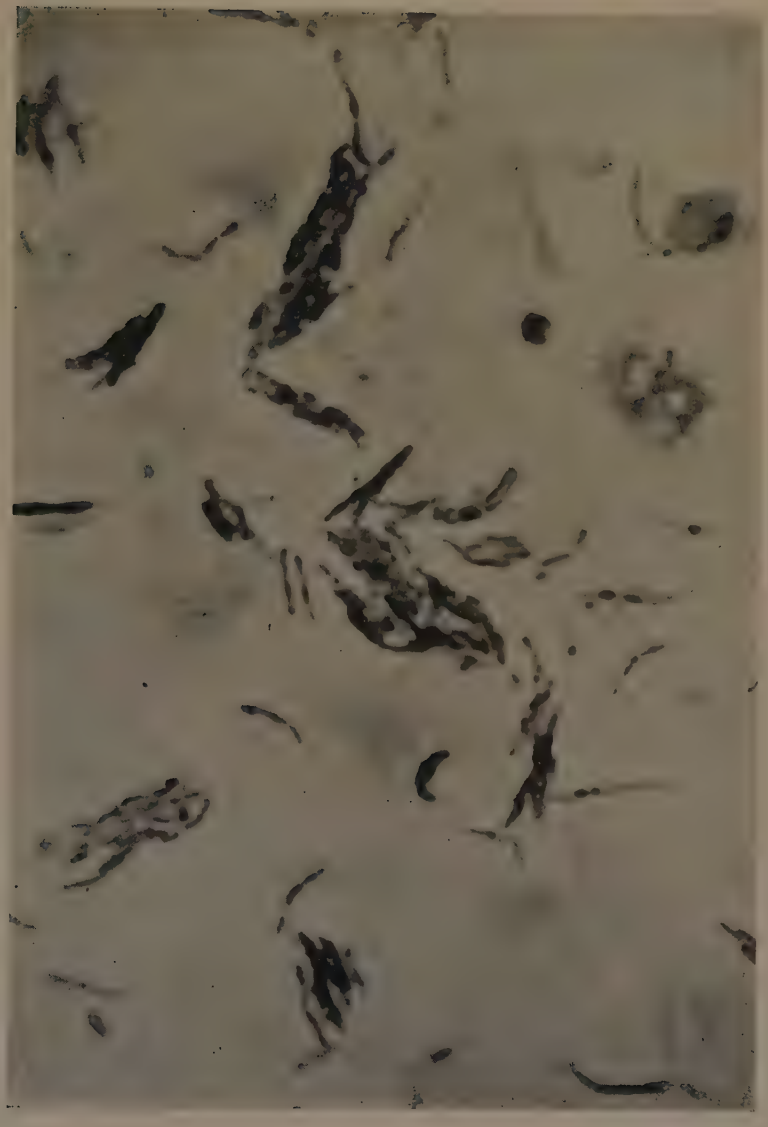

FIGURE N° 2.

Microphotographie de bacilles tuberculeux en multiplication obtenus par un prélèvement très précoce.

ÉTUDE COMPARATIVE DU MILIEU DE DUBOS ET DES MILIEUX CLASSIQUES

APPLIQUÉS AU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE

Chaque produit que nous recevons, et destiné à l'ensemencement, est systématiquement réparti en deux quantités égales,

La première est ensemencée sur les quatre tubes du milieu de DUBOS, suivant la technique que nous avons décrite, c'est-à-dire en n'ayant subi qu'un léger traitement par la soude.

La deuxième, traitée suivant la méthode classique, subit l'enrichissement habituel par la soude et l'acide chlorhydrique. Elle est ensuite ensemencée, à parties égales, sur deux tubes de LŒWENSTEIN-JENSEN et sur deux tubes de HERROLD.

De cette façon, nous pouvons comparer la croissance des cultures :

D'un côté sur le milieu synthétique.
De l'autre sur le milieu classique à l'œuf

ensemencés de façon égale.

I. *La sensibilité des milieux.*

Nous avons pratiqué 165 ensemencements sur chacun des milieux, et les résultats que nous avons obtenus sont réunis dans le tableau n° 1.

	NOMBRE D'ENSEMENCEMENTS	CULTURES POSITIVES	POURCENTAGE
DUBOS.	165 (4 tubes)	55	33,3 %
LŒWENSTEIN JENSEN. . . .	165 (2 tubes)	50	30,3 %
HERROLD. . .	165 (2 tubes)		

TABLEAU N° I.

Etude comparative du milieu de DUBOS et des milieux de LŒWENSTEIN-JENSEN et de HERROLD, appliqués au diagnostic bactériologique de la tuberculose.

Le nombre de cultures positives obtenues sur le milieu de DUBOS s'élève à 55, pour 50 cultures positives sur les deux autres milieux. Il semble donc que la sensibilité du milieu de DUBOS soit légèrement supérieure à celle du milieu à l'œuf.

La proportion de 33,3 % de cultures positives est, en effet, un chiffre entièrement satisfaisant.

BRUN et VALLIER [26] trouvent, dans leur étude, 63 % de cultures positives sur un milieu liquide de DUBOS. Mais les produits pathologiques employés étaient tous positifs à l'examen direct. Il n'a pas été vérifié, pour notre compte, si les produits ensemencés étaient positifs ou négatifs à l'examen direct.

Notre résultat ne concorde pas avec la statistique obtenue, lors d'un travail récent, paru dans l'*American Review of Tuberculosis* [27] et qui porte sur 7.362 spécimen de crachats.

Les auteurs trouvent, en effet, que le milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN est supérieur au milieu de DUBOS en ce qui concerne le nombre de cultures positives.

Par contre, une étude de Roberts WALLACE et ERLISH [28] fait apparaître que le milieu de DUBOS, surtout pour les faibles concentrations, est supérieur, pour le diagnostic bactériologique, au milieu de HERROLD.

II. *La fidélité des résultats.*

a) Le tableau n° 2 va nous permettre de comparer la fidélité du milieu de DUBOS par rapport à celle des milieux à l'œuf.

CULTURES + SUR DUBOS ET + SUR LŒW.-J. OU HERROLD	CULTURES + SUR DUBOS ET − SUR LŒW.-J. OU HERROLD	CULTURES − SUR DUBOS ET + SUR LŒW.-J. OU HERROLD
16	24	23

TABLEAU N° 2.
ETUDE DE LA FIDÉLITÉ DU MILIEU DE DUBOS PAR RAPPORT A CELLE DES MILIEUX A L'ŒUF.

Nous pouvons conclure à une fidélité sensiblement égale.
En effet,

24 fois le milieu de DUBOS a été positif alors que les deux autres milieux étaient négatifs.

23 fois le fait contraire s'est produit, c'est-à-dire que les milieux de LŒWENSTEIN-JENSEN et de HERROLD étaient positifs, le milieu de DUBOS n'ayant présenté aucune pousse.

Il est à remarquer que 16 ensemencements à peine ont été positifs à la fois sur les 3 milieux.

Ces faits paraissent en faveur de deux hypothèses :

1° Ou bien certaines souches de bacilles tuberculeux ont une affinité spéciale pour un milieu déterminé;

2° Ou bien, ce qui paraît d'ailleurs évident, plus la quantité de produit pathologique ensemencé est importante, plus on a de chance d'obtenir un résultat positif.

En définitive, si l'on veut être sûr de multiplier le nombre de résultats positifs, on doit à la fois ensemencer un très grand nombre de tubes, et ces tubes doivent contenir des milieux de culture différents.

b) En dehors de l'étude du milieu de DUBOS, nous avons pu remarquer que les cultures sur milieu à l'œuf avaient surtout poussé sur le milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN, le milieu de HERROLD s'étant révélé bien moins sensible.

Nous avons en effet obtenu 45 cultures positives sur LŒWENSTEIN-JENSEN pour 32 seulement sur le milieu de HERROLD.

D'autre part, sur les 50 cultures positives obtenues au total 27 ont été positives à la fois sur les deux milieux.

18 sur LŒWENSTEIN-JENSEN seul, le milieu de HERROLD étant négatif.

5 seulement sur le milieu de HERROLD, alors que le milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN était défaillant.

Ces résultats sont groupés dans le tableau n° 3.

Cultures + sur Lœw.-J. + sur Herrold	Cultures + sur Lœw.-J. − sur Herrold	Cultures − sur Lœw.-J. + sur Herrold
27	18	5

TABLEAU N° 3.

Etude comparative du milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN et du milieu de HERROLD appliqués au diagnostic bactériologique de la tuberculose.

Deux tubes de LŒWENSTEIN-JENSEN et deux tubes de HERROLD ont été ensemencés avec une quantité égale des mêmes produits pathologiques ayant subi le même traitement.

Pour apprécier la sensibilité et l'efficacité des milieux, il est fréquent que les auteurs confrontent les résultats avec l'inoculation au cobaye.

Nous n'avons pratiqué cette comparaison que lorsque les

besoins de la clinique l'ont exigé. Le peu de cobayes inoculés ne nous permet pas d'établir de conclusions.

Signalons toutefois que R. WALLACE et ERLISH [28] ont trouvé que le milieu de DUBOS était parfois supérieur à l'inoculation au cobaye.

Dans une statistique récente [29] portant sur 158 isolements, le milieu de DUBOS a donné entièrement satisfaction aux auteurs, et soutient, dans de bonnes proportions, la comparaison avec l'inoculation au cobaye.

III. *Etude comparative des milieux étudiés vis-à-vis du produit pathologique ensemencé.*

Il nous a paru intéressant de comparer le nombre de cultures positives obtenues sur chacun des milieux, à partir de chaque variété de produits pathologiques ensemencés (tubages - crachats - LCR - urines).

Le tableau n° 4 permet de lire les résultats :

	NOMBRE DE CULTURES	RÉSULTATS POSITIFS SUR DUBOS	RÉSULTATS POSITIFS SUR LŒW.-J. ET HERROLD
TUBAGES. . . .	118	37	38
L. C. R.	27	9	9
CRACHATS . .	17	8	3
URINES.	3	1	0

TABLEAU N° 4.

Comparaison du milieu de DUBOS et des milieux à l'œuf quant à l'efficacité de pousse vis-à-vis des divers produits pathologiques.

En ce qui concerne les liquides de tubage et les liquides céphalo-rachidiens, le milieu de DUBOS et le milieu à l'œuf sont doués d'une sensibilité égale.

Il n'en est pas de même pour les crachats et peut-être pour les urines où le milieu de DUBOS affiche une évidente supériorité.

Sur 17 crachats ensemencés, 8 ont été positifs sur le milieu de DUBOS alors que 3 cultures seulement ont été positives sur les milieux de LŒWENSTEIN-JENSEN et de HERROLD.

Le peu d'échantillons d'urines ensemencées ne nous permet pas une conclusion nette. Disons cependant qu'une seule a poussé sur DUBOS, restant négative sur les autres milieux.

Il y a là un problème qu'il serait intéressant d'approfondir et, en particulier, on peut se demander si cette différence provient du milieu lui-même ou de la différence des traitements qu'ont subi les produits pathologiques.

IV. *La rapidité de pousse.*

1. Nous avons signalé avec quelle rapidité les cultures pouvaient être considérées comme positives, et sous quelle forme typique se présentaient les bacilles en multiplication.

Il ne s'agissait pas, en effet, de quelques bacilles isolés ou de quelques bacilles adultes, issus du culot de centrifugation, et capturés avec les produits de prélèvement.

On était en présence de bacilles de Koch jeunes, trapus fourmillant sous l'œil du microscope.

Parfois moins abondants, plus élancés, ils étaient rassemblés dans un coin de la lame, déjà rangés en formations, laissant prévoir l'ordonnance ultérieure, plus typique.

La figure n° 2 nous montre cet aspect.

C'est ainsi que 17 de nos cultures ont été positives au premier Ziehl pratiqué, c'est-à-dire entre le quatrième et le huitième jour.

C'est là un délai vraiment sensationnel qui surprend le clinicien, habitué à attendre plus longtemps le résultat d'une culture.

Il faut cependant préciser que des résultats aussi précoces sont, en général, acquis sans qu'il y ait eu de colonies visibles. Il faut nécessairement pratiquer une coloration de Ziehl.

2. L'apparition de la colonie à la surface du milieu demande un peu plus de temps. Elle peut devenir perceptible dès le cinquième ou sixième jour. Mais, d'une façon générale, il faut compter entre huit et seize jours d'étuve.

Les divers expérimentateurs sont d'accord pour louer la rapidité avec laquelle les colonies se développent, que ce soit sur le milieu liquide ou le milieu solide de DUBOS [30], [31], [32].

Le temps d'apparition oscille entre six et quatorze jours.

Au cours de notre étude, la moyenne générale d'apparition des colonies a été de quatorze jours, chiffre vraiment peu élevé quand on pense que le milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN, ensemencé en même temps, a demandé un délai moyen de trente-six jours.

Quant au développement des colonies sur le milieu de HERROLD, il semble présenter deux dates optimum (vingt-huitième et soixante-troisième jour) [33].

Ainsi, le milieu de DUBOS présente le très gros avantage de permettre le développement rapide du bacille et l'isolement très rapide de souches de bacilles tuberculeux, à partir des produits pathologiques.

On peut donc prévoir, dans la pratique courante, une réponse rapide du Laboratoire, ce qui constitue un gros appoint pour le clinicien.

Dans certains cas, nous avons pu constater sur les lames, des bacilles de Koch peu nombreux, disséminés, d'allure moins jeune que ceux qui constituent les cordons. Ces bacilles ne se multiplient pas et restent rares à des examens répétés.

Les expérimentateurs [26], [34] qui avaient déjà signalé le fait pensent que ce phénomène serait dû à l'absence d'un facteur de croissance ou à la présence d'un facteur inhibiteur, empêchant, au cours de son développement, un accroissement plus généreux de la culture.

Nous verrons plus loin combien ces considérations sont importantes en ce qui concerne l'emploi courant du milieu de DUBOS au Laboratoire.

Nous venons de découvrir au milieu de DUBOS des avantages inestimables :

1. Facilité de préparation lorsqu'on possède les éléments de de base, fournis, dans le cas particulier, par les Laboratoires DIFCO.
2. Sensibilité et efficacité satisfaisantes.
3. Rapidité étonnante de pousse.

Ce milieu semble cependant présenter un inconvénient de taille qui réside en l'impossibilité, dans la majorité des cas, de lire facilement la culture.

Certes, certaines colonies sont absolument typiques et permettent à l'œil entraîné de reconnaître le bacille de Koch à la vue du tube ou de la boîte de PÉTRI.

Mais la plupart n'ont pu être identifiées avec certitude à cause de l'aspect polymorphe des colonies.

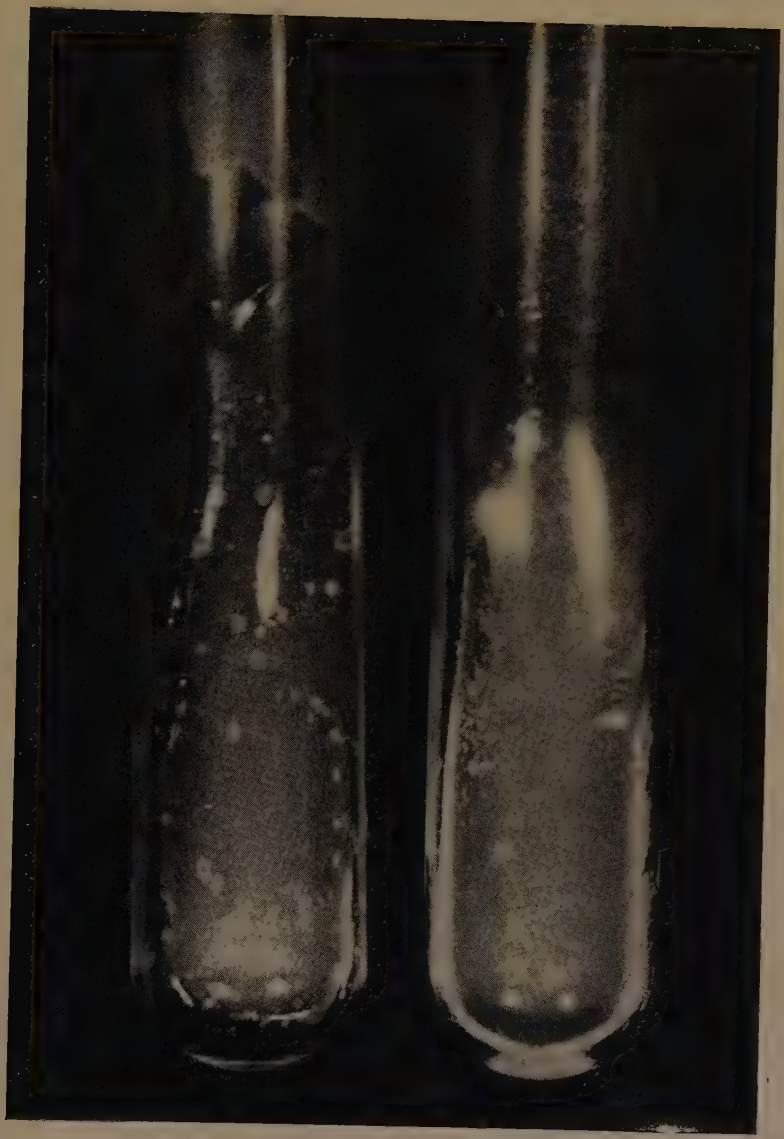

FIGURE N° 3.

La discrimination entre colonies de bacilles tuberculeux et contaminations est parfois malaisée. Les colonies au fond du tube sont des colonies de bacille tuberculeux; celles du haut du tube sont des contaminations comme l'a montré un Ziehl de contrôle.

LA LECTURE DES RÉSULTATS SUR LE MILIEU DE DUBOS

Le milieu de DUBOS est transparent : c'est un avantage, disent DUBOS et MIDDLEBROOK car il permet l'étude de la morphologie des cultures. Sur les boîtes de PÉTRI, la faible épaisseur du milieu permet l'étude par transparence des colonies poussant à sa surface. Sur les tubes, il nous a été plus difficile de détailler les divers aspects. Le moyen le plus simple nous a paru être la lecture des tubes sur fond noir où les colonies, de couleur blanchâtre, se détachent nettement.

GERNEZ-RIEUX [31] a mis en évidence sur ce milieu les trois types classiques de colonies :

a) Colonies petites, rondes, convexes, blanches et opaques, du type « smooth »;

b) Colonies plates, grandes, sèches, à contours irréguliers, du type « Rough »;

c) Un mélange des deux types précédents.

Nous avons retrouvé les trois types décrits par l'auteur, mais dans nos tubes, les colonies ne se sont pas limitées à ces trois sortes d'aspect.

Nous pouvons, en effet, décrire :

A. Des colonies considérées comme caractéristiques.

Elles sont représentées par de petites élevures blanches, opaques, arrondies, à bords généralement nets, de surface lisse et convexe. Ces colonies sont petites, de la grosseur d'un grain de mil à celle d'une tête d'épingle, rarement plus grosses.

Autre aspect évocateur : les colonies plates, grisâtres, plus grandes et plus irrégulières que les précédentes.

Ces pousses sont facilement dissociables de la contamination qui est, en général, plus étalée, légèrement bosselée, d'aspect

plus humide. La consistance est également un bon moyen de différenciation : les colonies de bacilles de Koch se détachent en bloc sous l'anse de platine. La contamination est souvent molle, parfois presque liquide.

B. Plus difficiles à individualiser,
des colonies blanchâtres, plus étalées, moins sèches que les typiques se désagrégeant sous l'anse de platine,
des voiles grisâtres légers, recouvrant la surface du milieu, transparents, facilement détachés par le râclage,
se sont révélés positifs sur un Ziehl de contrôle.

Ces aspects peuvent coexister en proportion variable, formant des dépôts complexes où seul le Ziehl peut affirmer la présence de bacilles de Koch.

C. A l'opposé, certaines colonies, dont l'aspect se rapproche beaucoup de l'aspect typique, et parfois prises pour des colonies de bacilles tuberculeux, se sont révélées, à l'étalement, être de simples contaminations.

Il s'agit, dans la grande majorité des cas, de coccis plus ou moins volumineux, non acido-alcoolo-résistants, apparaissant en bleu sur la lame.

Comme on peut en juger sur la figure n° 3, la discrémination macroscopique est parfois très malaisée.

Comment interpréter le polymorphisme de ces cultures?

L'explication la plus simple venant à notre esprit, réside en un défaut de la technique, ne permettant pas l'élimination complète des germes associés. Ces germes transformeraient l'apparence des colonies, donnant divers aspects suivant leur association plus ou moins abondante.

En effet, comme R. Dubos l'a fait remarquer [12], il est fréquent de rencontrer sur le Ziehl, des coccis plus ou moins nombreux, dont la présence ne gêne en rien la multiplication des bacilles.

La figure n° 1 illustre bien cette constatation.

En définitive, sans l'appoint du Ziehl de contrôle, nous n'avons pu affirmer avec certitude la positivité de la culture que dans la proportion de une culture sur cinq.

CONSIDÉRATIONS PRATIQUES SUR LE MILIEU DE DUBOS

Un des buts de notre étude était de voir si une primoculture sur le milieu de DUBOS pouvait permettre rapidement l'isolement de colonies de bacilles tuberculeux, en vue d'étudier, par la suite, leur sensibilité aux agents antibactériens.

Nous savons, en effet, comme l'ont précisé KARLSON, DELAUDE et NEEDHAM [25], qu'une primoculture paraît indispensable à une étude rigoureuse de la sensibilité des bacilles tuberculeux à la Streptomycine et au P. A. S.

Cette primoculture, nécessaire pour des ensemencements riches indispensables à la précision de la méthode, présente toutefois le grave inconvénient de retarder le résultat définitif de l'étude de la sensibilité. Si l'on avait pu gagner plusieurs jours, en utilisant le milieu de DUBOS et non pas un milieu à l'œuf pour cette primoculture, c'eût été un gros avantage.

Or, si l'on considère l'évolution des colonies sur le milieu de DUBOS :

1. On est frappé par le fait que leur développement ne dépasse pas un certain stade. Il semble que les colonies soient incapables de devenir volumineuses. Elles sont, assez fréquemment bien distinctes, homogènes, facilement dénombrées, mais elles conservent indéfiniment une taille en général très modeste.

2. D'autre part, l'élimination incomplète des germes associés rend aléatoire l'obtention de colonies pures de bacilles de Koch. Certes, les rares coccis que l'on retrouve en nombre restreint autour des cordons ne gênent pas la pousse des bacilles; mais ils risquent de se développer, par la suite, au cours des manipulations qui les porte sur les tubes de milieu

contenant le médicament vis-à-vis duquel la souche de bacilles tuberculeux sera étudiée.

3. La conséquence de cette association microbienne est que la morphologie des colonies est souvent perturbée, et que la lecture macroscopique est rendue parfois difficile.

Au moment du prélèvement, il devient malaisé, dans certains cas, de dire si l'on s'adresse à une colonie de bacilles tuberculeux ou à une contamination.

Ainsi donc, ces inconvénients :

Colonies de taille très parcimonieuse.
Elimination défectueuse des germes associés.
Difficulté de lire la culture

semblent s'opposer à l'utilisation pratique du milieu de DUBOS pour les primocultures destinées à l'étude de la sensibilité des souches de bacilles tuberculeux aux agents antibactériens.

CONCLUSIONS

Au cours de notre étude comparative, le milieu solide de DUBOS à l'acide oléique s'est révélé, pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose, légèrement supérieur au milieu de LŒWENSTEIN-JENSEN et au milieu de HERROLD en ce qui concerne le nombre de résultats positifs, et surtout la rapidité avec laquelle ces résultats pouvaient être obtenus.

Le milieu de DUBOS nous a toutefois paru présenter deux inconvénients :

1° Difficulté, au cours de la lecture macroscopique, de savoir, dans de nombreux cas, s'il s'agit de contaminations ou de colonies de bacilles tuberculeux;

2° Insuffisance de développement des colonies de bacilles tuberculeux et présence fréquente, au sein de ces colonies, de quelques germes de contamination.

Ces deux inconvénients rendent aléatoires les prélèvements effectués sur le milieu de DUBOS en vue d'étudier ultérieurement la sensibilité des souches de bacilles tuberculeux aux agents antibactériens.

VU : **Le Président de la Thèse,**
G. ANDRIEU

VU : **Le Doyen,**
LEFEBVRE

Vu et permis d'imprimer :

Toulouse, le 19 Octobre 1951

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
P. DOTTIN

BIBLIOGRAPHIE

[1] GASTINEL. — Précis de Bactériologie, 1949. Historique de la culture du bacille de Koch.

[2] DUBOS. — Rapid and submerged growth of mycobacterium in liquid media, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1945, 58, 351.

[3] DUBOS (R.) and DAVIS (B. D.). — Factors affecting the growth of Tubercle Bacilli in liquid media, *J. Exper. Med.*, 1946, 83, 409.

[4] DUBOS. — The effect of lipids and serum Albumin on bacterial growth, *J. Exper. Med.*, 1947, 85, 9.

[5] DUBOS, DAVIS, MIDDLEBROOK, PIERCE. — The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of tubercle bacilli, *Am. Rev. of Tuberculosis*, 1946, 54, 204.

[6] DUBOS. — Effect of long chain fatty acids on bacterial growth, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1946, 63, 56.

[7] FOLEY (G. E.). — Submerged growth of tubercle bacilli from pathologic material in Dubos medium, *Proc. Soc. Exper. Biol and Med.*, 1946, 62, 298.

[8] GERNEZ-RIEUX, SEVIN, SPY (M^lle^). — Le milieu de Dubos. Son application à l'étude de la biologie du bacille tuberculeux et au diagnostic de la tuberculose, *Revue de la Tuberculose*, 1948, 12, 41.

[9] DELAUDE (A.). — Contribution à l'étude des bacilles tuberculeux résistant à la Streptomycine et au P. A. S., Thèse, Toulouse, 1950.

[10] BERNARD (F.), BRAUN et KREIS. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1949, pp. 136-140.

[11] CORPER (H. J.)., COHN (M. L.) and FREY (W. H.). — Submerged suspended liquid culture of M. Tuberculosis and other acid-fast bacilli under the influence of physical and chemical factors, *Am. Rev. of Tuberc.*, août 1948, n° 2, pp. 215-229.

[12] Dubos (R.), Middlebrook. — Media for tubercle bacilli, *Am. Rev. of Tuberc.*, octobre 1947, n° 4, pp. 334-345.

[13] David and Dubos. — The binding of fatty acids by serum albumin a prospective growth factors in bacteriological media, *J. Exper. Medecine*, 1947, 86, 215.

[14] Bretey (J.) et Andrejew. — Respiration du bacille tuberculeux sur le milieu de Dubos, *C. R. Soc. de Biologie*, février 1949, pp. 171-174.

[15] Tison (F.). — Culture de bacilles de Koch à partir de crachats non modifiés en présence de Pénicilline, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1947, n° 4, p. 407.

[16] Kirby and Dubos. — Effect of Penicillin on the tubercle bacilli in vitro, *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1947, 66, 120.

[17] Dubos (R.), Noufflard (H.). — Milieux semi-synthétiques à l'Albumine pour la culture du bacille tuberculeux, *Annales de l'Institut Pasteur*, février. 1950, pp. 208-226.

[18] Bezançon, Braun et Meyer. — Sur la valeur pratique de la culture du bacille de Koch dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire, *Revue de la Tuberculose*, 1948, n°s 11 et 12.

[19] Gardner, Middlebrook. — Media for the cultivation of tubercle bacilli and their clinical and experimental application, *Procedings of the New-York States Assoc. of Public Health Laboratoris*, 1947, n° 1, pp. 28-31.

[20] Nedelkovitch. — Mode de multiplication du bacille de Koch. Morphologie du bacille et de ses colonies, *Annales de l'Institut Pasteur*, février 1950, pp. 177-189.

[21] Bretey (J.) et Imelik (M^me^ S.). — Multiplication du bacille de Koch aviaire sur le milieu de Dubos, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1949, pp. 228-236.

[22] Middlebrook, Dubos, Pierce. — Virulence and morphological characteristics of mamalian tubercle bacilli, *J. Experim. Med.*, 1947, 86, 175.

[23] Pierce, Dubos, Middlebrook. — Infection of mice with tubercle bacilli grown in Tween Albumin liquid media, *J. Exper. Med.*, 1947, 86, 159.

[24] Levaditi, Kreis. — Techniques de Laboratoire en Pneumologie, *Collection de l'Institut Pasteur*, p. 129.

[25] KARLSON, DELAUDE, NEEDHAM. — L'emploi de la gelose au jaune d'œuf pour la mise en évidence des bacilles tuberculeux résistant à la Streptomycine et à l'acide para-amino-salicylique, *Annales de l'Institut Pasteur*, janvier 1950.

[26] BRUN et VALLIER. — Isolement direct en milieu de Dubos, de souches de mycobacterium tuberculosis, à partir de produits pathologiques, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, n^{os} 3-4, p. 263.

[27] MELVIN (J.), KLEIN (G. G.), JONES (W.) and CUMMINGS (M. M.). — An evaluation of media for diagnostic cultures of tubercle bacilli, *Am. Rev. of Tuberculosis*, avril 1951, pp. 459-469.

[28] WALLACE (Roberts) and ERLISH. — Methods for isolating tubercle bacilli, *Am. Rev. of Tuberc.*, avril 1950, pp. 564-567.

[29] ZUCKERMAN (Anne) and RANTZ (Lowell A.). — The Use of a Dubos type solid medium containing Penicillin for the primary isolation of M. Tuberculosis from human discharges, *Am. Rev. of Tuberc.*, sept. 1951, pp. 318-321.

[30] HAUDUROY. — *Annales de Biologie Clinique*, janvier-février 1950, n° 1.

[31] GERNEZ-RIEUX, SEVIN et SPY (M^{lle}). — Contribution à l'étude de la culture du bacille tuberculeux sur le milieu synthétique de Dubos, *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*, 1948, pp. 175-197.

[32] VALTIS, DENISE (Van) et SOLOMIDES. — Essais de culture de bacilles tuberculeux dans le milieu de Dubos, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1948, 74, 134.

[33] CARBONNIER (J.). — Les incidences pratiques de la culture du bacille de Koch dans la tuberculose pulmonaire, Thèse, Toulouse, 1951.

[34] GERNEZ-RIEUX, SEVIN et SPY (M^{lle}). — Utilisation du milieu de Dubos pour la culture du mycobacterium tuberculosis à partir de produits pancibacillaires, *C. R. Soc. Biol.*, mars 1948, p. 327.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. 9

La naissance et l'évolution des milieux de Dubos. 11

Le milieu solide de Dubos à l'Acide Oléique. 13

I. Sa composition - Sa préparation. 13

II. Son utilisation. 14

A. L'ensemencement. 14

B. Les prélèvements précoces : les cordons. 15

Etude comparative du milieu de Dubos et des milieux classiques appliqués au diagnostic bactériologique de la tuberculose. 19

I. La sensibilité des milieux. 19

II. La fidélité des résultats. 21

a) Sur le milieu de Dubos par rapport aux milieux à l'œuf. 21

b) Sur les milieux de Lœwenstein-Jensen et de Herrold. 22

III. Etude comparative des milieux étudiés vis-à-vis du produit pathologique ensemencé. . . . 23

IV. La rapidité de pousse. 24

La lecture des résultats sur le milieu de Dubos. 27

Considérations pratiques sur le milieu de Dubos à l'acide oléique. 29

CONCLUSION. 31

BIBLIOGRAPHIE. 33